

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-070898

(43)Date of publication of application : 19.03.1996

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
// C12N 15/09

(21)Application number : 06-214055

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 07.09.1994

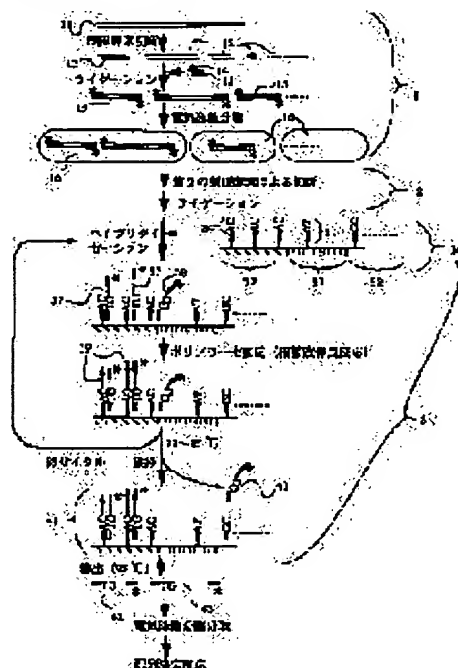
(72)Inventor : KANBARA HIDEKI
OKANO KAZUNOBU

(54) SEPARATION AND FRACTIONATION OF DNA AND ITS ANALYSIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a DNA analysis method which does not use a troublesome subcloning process unsuitable for automation.

CONSTITUTION: A double-stranded DNA is cut with a restriction enzyme to obtain a fragment mixture containing an oligomer having known sequence and introduced by ligation reaction. A fragment is collected by using a chip holding a fixed oligomer having a complimentary sequence to the known sequence and 2-3 bases continuing the 3' site of the sequence and is subjected to a complementary chain synthesis. The synthesized chain is fractionated and roughly separated by electrophoresis. Finally, the sequence is determined by using an oligomer having the known sequence and the continuing two bases. The analysis of DNA can be carried out without using a cloning procedure by classifying by the DNA terminal sequence and separating and fractionating by electrophoresis.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 06.04.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2004-09341

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 06.05.2004

REST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-70898

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 Q 1/68
// C 1 2 N 15/09

識別記号 片内整理番号
Z N A A 9453-4B
9281-4B

F I

C 1 2 N 15/ 00

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-214055

(22) 出願日 平成6年(1994)9月7日

(71) 出願人 000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(72) 発明者 神原 秀記
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72) 発明者 岡野 和宜
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

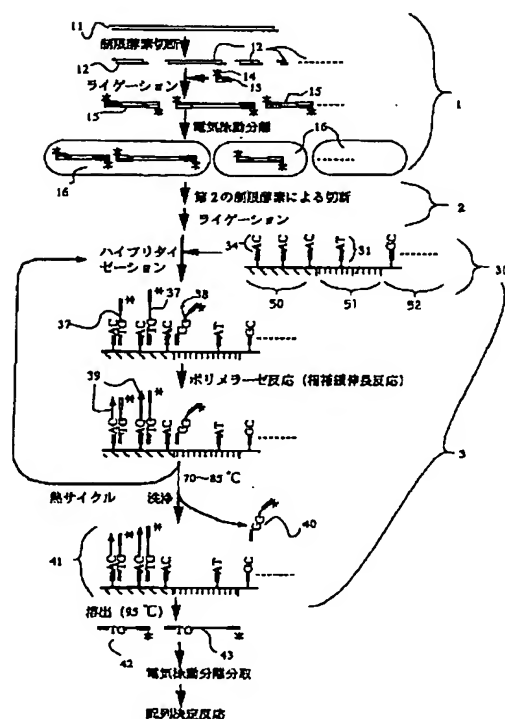
(54) 【発明の名称】 DNAの分離・分取法及びその解析法

(57) 【要約】

【目的】 煩雑で自動化に適さないサブクローニングプロセスを行わないDNA解析法を提供する。

【構成】 2本鎖DNAを制限酵素で切断し概知配列オリゴマーをライゲーション反応で導入したフラグメント混合物を得る。上記概知配列に相補的配列とその3'に続く2～3塩基を持つオリゴマーを固定したチップを用いて上記フラグメントを捕捉し、相補鎖合成する。相補鎖合成したものを分取し、電気泳動によりおおまかに分取する。最後に概知配列とそれに続く2塩基のオリゴマーを用いて配列決定する。

【効果】 DNA末端配列による選別と電気泳動分離分取により、クローニングを行わずにDNAの解析が可能となる。



1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも、複数の DNA 断片に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセス、得られる DNA 断片を、既知配列部を含み 3' 末端側 1 ~ 3 塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップを用いて当該チップ上のオリゴマーにハイブリダイズさせるプロセス、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成で上記のハイブリダイズしたチップ上のオリゴマーのうち特定のもののだけを伸長させて DNA 断片とのハイブリダイゼーション力を増強させるプロセス、次いで加温処理して特定の DNA 断片を選別分取するプロセスを含むことを特徴とする DNA 断片の分離・分取方法。

【請求項 2】 少なくとも、複数の DNA 断片に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセス、得られる DNA 断片を、既知配列部を含み 3' 末端側 1 ~ 3 塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップを用いて当該チップ上のオリゴマーとハイブリダイズさせるプロセス、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成で上記のハイブリダイズしたチップ上のオリゴマーのうち特定のもののだけを伸長させて DNA 断片とのハイブリダイゼーション力を増強させるプロセス、次いで加温処理して特定の DNA 断片を選別分離・分取するプロセス、前記特定の DNA 断片のコピー数を増幅し又は増幅することなくその DNA 配列を解析するプロセスを含むことを特徴とする DNA 解析方法。

【請求項 3】 少なくとも、DNA 配列を制限酵素で切断して DNA 断片を調製するプロセス、得られる DNA 断片を、既知配列部を含み 3' 末端側 1 ~ 3 塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップを用いて当該チップ上のオリゴマーとハイブリダイズさせるプロセス、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成で上記のハイブリダイズしたチップ上のオリゴマーのうち特定のもののだけを伸長させて DNA 断片とのハイブリダイゼーション力を増強させるプロセス、次いで加温処理して特定の DNA 断片を選別分取するプロセスを含むことを特徴とする DNA 断片の分離・分取方法。

【請求項 4】 少なくとも、DNA 配列を制限酵素で切断して DNA 断片を調製するプロセス、得られる DNA 断片を、既知配列部を含み 3' 末端側 1 ~ 3 塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップを用いて当該チップ上のオリゴマーとハイブリダイズさせるプロセス、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成で上記のハイブリダイズしたチップ上のオリゴマーのうち特定のもののだけを伸長させて DNA 断片とのハイブリダイゼーション力を増強させるプロセス、次いで加温処理して特定の DNA 断片を選別分離・分取するプロセス、前記特定の DNA 断片を増幅し又は増幅することなくその DNA 配列を解析するプロセスを含む

2

ことを特徴とする DNA 解析方法

【請求項 5】 少なくとも、複数の DNA 断片に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセス、既知配列部を含み 3' 末端側 1 ~ 3 塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップと、DNA 断片の末端に結合した共通配列を持つ固定されていないプライマーとを用いて当該 DNA 断片のコピー数を酵素を用いた相補鎖合成反応を用いて増幅すると共に DNA 断片の種類毎に分離して固体表面上に分離・分取する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は DNA 塩基配列決定あるいは DNA 解析などに用いる DNA の分離・分取、更には試料調製法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来長い DNA の塩基配列を決定する場合、目的とする DNA をプラスミドなどのベクター中にクローニングし、培養により DNA のコピー数を増やし用いている。この DNA (ここでは数十 Kb) の塩基配列を決定するには DNA を制限酵素で切断し、小さな断片とした後、再度クローニング (サブクローニング) した後、大腸菌等に感染させ、この大腸菌をコロニー培養してコピー数を再度増やすと同時にコロニー選別により DNA 断片の分別を行う。すなわち、DNA を制限酵素切断し、サブクローニングとそれに続くコロニー培養により、DNA 断片の精製分取と増幅を行う。寒天上で培養された大腸菌は前述したようにコロニーを形成する。各コロニー中には単一種の DNA 断片を含んだプラスミドを持った大腸菌が含まれている。各コロニーから大腸菌をピックアップして試験管培養してコピー数を更に増やした後、DNA を抽出して塩基配列決定用試料として用いる。種々 DNA 断片を解析するには種々コロニーから得た DNA を解析するが、同じ DNA 断片のクローンを含んだコロニーを重複して解析する場合が生ずるため DNA 断片種の数の平均 4 倍位の数のコロニーを解析することが多い。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 このようなサブクローニングを用いた DNA 調製は、DNA 断片の分離と増幅を 1 つのプロセスでできる反面、手間がかかり、自動化に適さない難点があった。また、各コロニー中にはどの DNA 断片種を含んだ大腸菌が含まれているかをあらかじめ知ることができないため、同じ DNA 断片を何度も解析する無駄をしてしまう難点があった。そこで、サブクローニング、培養といった手間がかかり、自動化に不向きなプロセスに代わる DNA 断片の分取・増殖法およびこれを用いた DNA 解析システムを提供するものである。

【0004】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】上記目標を達成するために本発明者らはDNA断片をPCR(Polymerase Chain Reaction)により増殖することと、ゲル電気泳動によるDNA断片の長さ分離および分取、更にDNA断片と固体表面に固定されたDNAプローブをハイブリダイズさせ、プローブDNA鎖の伸長反応がおきるか否かによりDNAを分別・分取する方法を開発し、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、少なくとも、複数のDNA断片に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセス、得られるDNA断片を、既知配列部を含み3'末端側1~3塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップを用いて当該チップ上のオリゴマーにハイブリダイズさせるプロセス、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成で上記のハイブリダイズしたチップ上のオリゴマーのうち特定のもののだけを伸長させてDNA断片とのハイブリダイゼーション力を増強させるプロセス、次いで加温処理して特定のDNA断片を選別分取するプロセスを含むDNA断片の分離・分取方法にある。

【0006】さらに、本発明は、上記方法により分離・分取されたDNA断片のコピー数を増幅し又は増幅することなくそのDNA配列を解析するDNA解析方法にある。上記DNA断片の分離・分取方法或いは該DNA断片の配列を解析するDNA解析方法における出発物質としてのDNA断片は、いずれの処理方法により調製したものでもよいが、例えば、DNAを制限酵素で切断したDNA断片が用いられる。この制限酵素としては、対象とするDNA配列により適宜選択されるが、例えばHind III、Sau3AI、NotI、ECORI等が挙げられる。

【0007】さらに、本発明は、少なくとも、複数のDNA断片に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセス、既知配列部を含み3'末端側1~3塩基が任意であるオリゴマーを当該任意配列の種類毎に固体表面に固定したチップと、DNA断片の末端に結合した共通配列を持つ固定されていないプライマーとを用いて当該DNA断片のコピー数を酵素を用いた相補鎖合成反応を用いて増幅すると共にDNA断片の種類毎に分離して固体表面上に分取する方法にある。

【0008】上記方法に用いるオリゴマーにおいて、その既知配列部の塩基長はハイブリダイゼーションにより安定な二本鎖形成の要件を満たすものであり、10~30 mer好ましくは16~20 merである。このオリゴマーには標識を付した方がその後の分離操作のために都合がよい。そして、この標識物としては、蛍光体、化学発光を誘起する物質、放射性物質などが用いられる。

【0009】ゲル電気泳動による分離・分取方法はポリアクリルアミドゲル(6%)板を用いDNAバンドを切り出す方法、チューブゲル末端から溶液中にDNAを溶出させ分取する方法等が用いられている。本発明のオ

リゴマーチップは次のように調製する。固定表面へオリゴマーを固定する手法は文献Clinical Rem. 39, 718-722 (1993)によるか、あるいはNature 357, 519(1992)と同様ポリTを保持するプラスチック表面を用いポリAと目的とするオリゴマー配列に相補な配列を持つオリゴマーをポリTにハイブリダイズさせた後相補鎖合成により目的とするオリゴマーをポリTの3'端側に作製する。このオリゴマーチップの固体基盤としては、石英板、シリコンウェハー等が用いられる。

【0010】DNAポリメラーゼによる相補鎖合成は、Taqポリメラーゼ2ユニットに基質dNTP(デオキシヌクレオチドトリフォスフェート)をチップを保持した容器に加え、反応温度75℃の条件で行う。DNA断片のコピー数を酵素を用いて増幅する方法は、通常行われているPolymerase Chain Reaction(PCR)条件のとおり行う。DNA配列を解析は蛍光式自動DNAシーケンサーを用い、その標準プロトコールのとおり行う。

【0011】

【作用】PCRはDNA断片のコピー数をふやすのに有効であり、ゲル電気泳動はDNA断片を長さにより分離し、グループ化するのに有効である。ゲル電気泳動分離を用いて分取したDNA断片は両端には既知配列のオリゴマーをライゲーションにより付加する。この配列を含み3'末端に任意の2つの塩基を持つオリゴマーを末端配列毎に区分して、5'末端側を底面に固定した容器を用意する。DNA断片を含む溶液を容器に入れ、固定されたオリゴマーとハイブリダイズさせる。DNAポリメラーゼを用いてオリゴマーの鎖を伸ばすが、3'末端配列が相補的な場合だけ鎖伸長がおこり、結合力が増す。そこで温度を上げ(70~85℃)相補鎖伸長しなかったオリゴマーとDNA断片の結合を分断し、相補鎖伸長したハイブリドマーだけが固体表面にのこるようにして分取する。相補鎖合成は3'末端2塩基が一致する場合は伸長するが一致しない時は伸長しないか、伸長反応はおそいので末端塩基種の違いで分離・分取できる。2塩基の組合せ数は16通りであり多くのDNA断片を一度に分離・分取できないが、ゲル電気泳動による長さ分離を組み合わせると非常に多くのDNA断片種を分離・分取できる。このように分取されたDNA断片はPCR増幅され、DNA塩基配列決定反応に用いられる。

【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】図1は本発明によるDNA解析のフローチャートである。試料としてλファージDNAを選んだ。λDNAを6塩基認識制限酵素たとえばHindIIIを用いて切断する。この酵素は図2に示した配列10を認識して、図示した所でDNAを切断する。切断されたDNA断片12に既知配列を持つDNAオリゴマー13(図2に表

示)をライゲーションにより結合させる。オリゴマーとして蛍光標識14されたものを用いると以下の分取操作に都合が良く、ここではスルホローダミン 101 (Texas Red; 発光波長620nm)で標識されたオリゴマーを用いた。ライゲーション産物はアクリルアミドゲル電気泳動で分離され、分取される。各フラクション中のDNA断片種数はゲル電気泳動の分離能によるが、数kb以下のDNA断片を分離する場合、長さの1%程度の精度で分取できる。そのため各フラクション中には図1の16のように2~6種以下のDNA断片種が含まれるようにできる。これらDNA断片を図1の2のようにフラクション毎に再度別の制限酵素で再度切断する。制限酵素としてSau 3A Iなどの4塩基認識切断酵素を用いた。切断部には前述既知配列を持ったオリゴマーをライゲーションにより結合する。切断部や概知オリゴマー配列図3に示した。前述の既知配列と異なる配列を選択しても良い。オリゴマーには蛍光標識14を付加しておき、検出が容易にできるようにする。

【0013】得られたDNA断片を分離・分取するために図1に示したようなオリゴマーを保持したチップ30を用意する。チップ上にあるオリゴマーは図4に示したようにリンカー181を介して5'末端側を固体表面180に固定されたもので、ライゲーションによりDNA断片試料に付加されたオリゴマー配列32とその3'側に制限酵素認識配列の一部33を含むものである。このオリゴマーはすべてのDNA断片とハイブリドマーを形成するがDNA断片種を区別するために更に3'端に2つ(1~3塩基でよい)の任意塩基34を持つものを用いる。任意の2塩基の選び方は16通りあるのでチップ表面を図5に示したように隔壁202で16分割し、それぞれの区画201に単一種のオリゴマーを固定する。このチップを用いてDNA断片試料を分離・分取するが、DNA断片の制限酵素認識配列に続く2塩基の配列の違いにより相補鎖合成が伸長するか否かでハイブリダイゼーションの安定度が大きく変化することを利用して分離分取する。DNA断片はチップ上のオリゴマーの3'末端の2塩基以外は完全に相補的であり、ハイブリダイゼーションの強弱で末端2塩基が相補的か否かを見分けることは難しい。しかし、DNAポリメラーゼを用いた相補鎖伸長反応はプライマーとして用いるオリゴマーの3'末端2塩基に大きく依存する。また、相補鎖伸長したオリゴマーとDNA断片の結合力は非常に強くなる。そこで図1の30の表面に固定したオリゴマー31とDNA断片37, 38とをハイブリダイズさせた後DNA相補鎖伸長反応を行い、鎖伸長したオリゴマー39に結合したDNA断片だけを得ることで分離・分取する。チップを底面とする容器中に(容器の底面にチップを置いてもよい)DNA断片試料を入れ、オリゴマーとハイブリドマーを形成させる。これにTaq DNAポリメラーゼおよび相補鎖合成基質dNTP(デオキシヌクレオチドトリフォスフェート)を加えて相補

鎖合成する。ハイブリドマーのうちオリゴマーの3'末端の2塩基が完全にDNA試料と相補的なもの37については相補鎖合成が進行し、表面に固定されたオリゴマーの鎖が伸長する。末端2塩基が完全には相補的でないもの38について相補鎖伸長はおこらないかおこっても非常におそい。末端2塩基が相補的でなくても相補鎖合成がおきる事がある。特にこの2塩基がGあるいはCの組み合わせで、1つが他の塩基におき代わった場合などである。この場合、末端から3塩基目をイノシンなど相補鎖結合能の弱い塩基か相補的でない塩基を持つオリゴマーを固体表面に固定し用いると良い。この場合、3塩基目の結合が弱いので末端2塩基が相補的でないとより一層相補鎖合成がおこりにくくなり、実質的に末端2塩基が一致するものだけに相補鎖合成がおきるようにできる。反応はTaqポリメラーゼの反応に都合の良い75℃で行った。反応後、溶液の温度を80~85℃にまで高めて相補鎖伸長しなかったハイブリドマーの結合を切り、末端2塩基が完全に相補的でないものは40のように遊離される。一方、41のように相補鎖伸長したハイブリドマーはそのままオリゴマーと共に固定表面に保持される。この反応と昇温をくりかえす事により、DNA断片の分離率を上げることができる。たとえば1回の反応で特定のDNA断片が16種あるDNAオリゴマーと完全にハイブリダイズし、相補鎖伸長できる確立は1/16である。昇温して未反応DNA(全体の15/16)を剥がし、再度ハイブリダイズさせると更にこの1/16。(すなわち、15/16 × 1/16)が所定の所にハイブリダイズして相補鎖伸長されたオリゴマーにトラップされる。この結果が約1/8が所定位置にトラップされる。10回くりかえすとこの断片の約半分が相補鎖伸長して所定の区画に捕獲されることになる。このように分画されたDNAだけを分取するには溶液温度を85℃近傍にし相補鎖伸長してないハイブリドマーを解離させ洗浄する。各区画に保持されたDNA断片を95℃で溶出させ区画毎にキャピラリー等を用い分取する。この時ゲル充填キャピラリーを用い分離も同時に行うことにより詳細な分離・分取ができる。ここでゲル電気泳動を用いるのは、42, 43のように3'末端の2塩基が同一で異なるDNA断片が存在し得るからである。また、DNA断片の長さを知ることにより、1回で塩基配列決定(DNAシーケンシング)できる断片か否か知り、シーケンシングする上での情報とするためである。DNA断片の長さが1Kb(1000塩基)以下の場合には長いゲル(50~60cm)を用いた電気泳動(1000塩基長近くまで分離可能である)を用いるか、または、500~600塩基長まで配列を読み取っては新しいプライマーを用いて次の配列決定をしてゆく方法(ウォーキング法)が適している。一方、1Kbを越える場合には別の制限酵素で切断して短小化するか、プラスミドなどにクローニングした後に末端から削ってゆくデリーション法により種々長さのDNAを生成してこれを解析する方法が

適している。このようにDNA塩基配列決定は対象とするDNA断片の長さによりその解析戦略が異なるのでDNA断片長をゲル電気泳動分離の際に知ることは重要である。ゲル電気泳動分離・分取には内径0.3mm、長さ20cmのガラスキャピラリー内に作製した柱状ゲル（キャピラリーゲル、4%）を用い、キャピラリー下端から溶出してくるDNAを蛍光検出器でモニターしながら分取した。各フラクション中に含まれるDNA断片の3'末端側の制限酵素認識部へ続く2塩基は既にわかっているので、共通部分に加えてこの2塩基と相補的な配列を3'末端に持つプライマーと概知の共通部配列（ライゲーションで付加したオリゴマーの一部）だけを持つプライマーを用いてPCR増幅を行いDNA断片のコピー数を増やして塩基配列決定の鋳型とし、解析を行った。

【0014】本実施例ではオリゴマーを保持したチップを用い、種々DNA断片を末端配列毎に分画した後に電気泳動分離したが、逆を行っても良い。すなわちゲル電気泳動によりDNA断片群を長さ分離する。DNA断片の長さが1Kb以下の場合には長さ分離の精度は1~2bあり、DNA断片混合物を1つのフラクション当り2~6種とすることは容易である。（DNA断片は2本鎖のまま扱うので2種のDNA分取が最小である。）各フラクション中のDNA断片の末端2塩基（制限酵素切断配列に続く2塩基）を16種類のオリゴマーを保持したチップを用いたDNA相補鎖合成を行い相補鎖伸長の有無により末端塩基を識別して分画し、PCR増幅してDNA塩基配列決定試料とする。

【0015】〔実施例2〕図6は塩基配列決定の一例でM13ファージDNAをHind IIIとSau3AIで分解したフラグメントを分析したものである。塩基配列決定プライマーには図7に示したように分画の時用いた共通配列の一部300と3'末端に2つの任意配列301を持つものを用いた。末端2塩基の異なるプライマーを用いると全く相補鎖合成は行われず、配列情報は得られない（図6-(5)）。

。フラクション中に一種のDNA断片があると塩基配列決定反応とゲル電気泳動に基づくDNAシーケンサーにより図6-(1)に示すスペクトルが得られ配列決定ができる。一方、電気泳動分離をしなかったり、フラクション中に多くの断片が含まれる場合には1つのフラクション中に同じ末端2塩基配列を持つDNA断片が2種以上含まれている確立が高い。たとえば2種のDNA断片が含まれているときには（図6-(2)）のように得られるシーケンシングスペクトル中には2種のDNA断片に起因するピークが重なるため複雑になるが、3'末端に3塩基選択配列を持つプライマー311を使用し配列決定してDNAシーケンシング反応することでそれぞれの塩基配列情報を得ることができる（図6-(3), (4)）。

長いDNAを細かく切断すると多くの断片種ができ手間がかかるので、一度に多くの断片種を多く作らず、まずDNAを6塩基認識酵素で切断して電気泳動ついでオリ

ゴチップで分取し、次いで各断片毎に4塩基認識酵素で切断して解析可能なサイズにしてからゲルおよびオリゴチップを用いて分画するのが良い。

【0016】〔実施例3〕本実施例は元のDNA断片コピー数が少ない場合の例である。DNAを酵素などで断片化して、オリゴマーをライゲーションにより結合させる。ゲル電気泳動により長さ分取する。1つのフラクション中には数種のDNA断片が含まれているが、これを底面に分画用オリゴマーを固定した容器に移し、ハイブリダイズさせた後相補鎖合成をする。次いで80℃に昇温し、相補鎖伸長しなかったハイブリドマーを解離させ、降温後再度相補鎖合成をする。この操作を数回くり返した後、ライゲーションに用いたオリゴマーと同じ配列のプライマーを添加し、PCR増幅を行う。増幅は溶液中及び固体表面で起こるが添加プライマーを量を少なくすると固体表面で相補鎖合成の割合が増える。また、DNA断片の両端にそれぞれ異なる配列のオリゴマーを連結させると固体表面でのPCR増幅だけを起こすことができる。すなわち、片方のオリゴマー配列を持ったプライマーを固体表面に固定し、もう一方のDNA末端に結合したオリゴマー配列と同じ配列のオリゴマーを溶液中加入する。両プライマーが揃って初めてPCR増幅が起こるのでDNA断片の増幅は固体表面だけで起こる。なお、ここでは平板状の固体表面を用いたがビーズ、キャピラリーあるいは多孔質の固体を用い、表面積をふやして保持するオリゴマーの数を多くして効率を上げることもできる。

【0017】

【発明の効果】DNA断片の長さによる分離およびDNA末端配列による選別を合わせる事で単一のDNA断片をクローニングせずに得ることができ、PCRを組み合わせてクローニングプロセスなしに長いDNAを断片化し、各断片を分離してコピー数をふやして塩基配列の決定などの解析を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明を示すフローチャート。

【図2】試料DNAを制限酵素切断し末端に概知配列を導入する方法を示す図。

【図3】試料DNAを他の制限酵素で切断し末端に概知配列を導入する方法を示す図。

【図4】チップ上に固定されたプローブの構造を示す図。

【図5】プローブチップ表面の構造を示す図。

【図6】配列決定例を示す図。

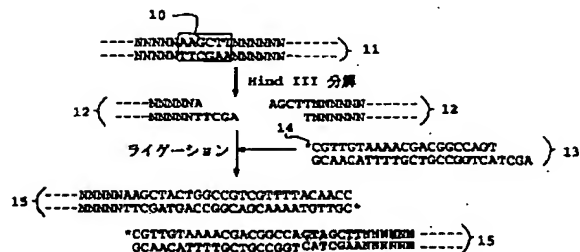
【図7】配列決定に用いたプローブを示す図。

【符号の説明】

1…第1の制限酵素による試料DNAの断片化とおおまかの分離の行程、2…第2の制限酵素による再断片化の行程、3…オリゴマー固定チップによるDNA断片の分離の行程、10,110…制限酵素認識部位、11…試料DNA、1

* 鎖伸長したオリゴマーに保持されたDNA断片を持つチップ、42, 43…回収されたDNA断片、50, 51, 52…異なるオリゴマーを固定したチップ上のオリゴマー固定区画、180…固体表面、181…リンカ、201…オリゴマー固定区画、202…隔壁、300…共通配列部分、301…任意配列部分、310…任意配列部分の配列（2塩基の例）、311…任意配列部分の配列（3塩基の例）

【図 2】



181- CGTGTAAAACGACGGCCAGT- 34- 180

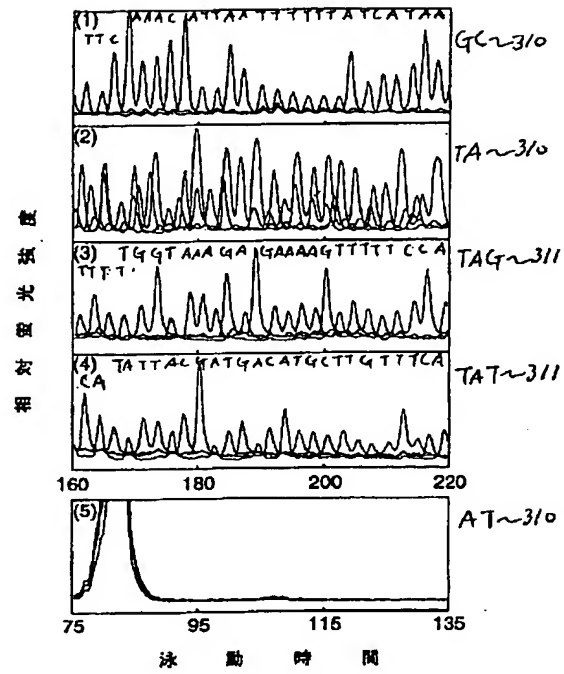
 (X: 任意のA,C,G,T)

Figure 1 is a schematic diagram of a 4x4 grid of 16 square cells. The grid is enclosed in a rectangular frame. A label '201' with a curved line points to the top-left cell. A label '202' with a curved line points to the top-right cell.

110
 ---NNNNNGATCGNN---
 ---NNNNCTAGNN---
 ↓ 5≒3A1分第
 122 { ---NNNNN
 ---NNNNCTAG
 GATCGNN--- } 122
 NNNN
 ライゲーション ↓
 14
 *CCTTTAAAAACGACGCCAGT
 GCACATTTTCTGCTGCCGGTCACTAG } 113
 113 { ---NNNNNGATCACTGGCCGTCCTTTTACACC
 ---NNNNCTAGTACCGCGCAGCAAAATGTTGC*
 *CCTTTAAAAACGACGCCAGTGCATCGNNNN
 GCACATTTTCTGCTGCCGTCCTTAGNNNNN } 115

300
ACGACGGCCAGTAGCTTXX (X: 任意のA,C,G,T)
301

【図6】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.